

# 高感度イムノセンシング系の構築を指向した固相基板上への抗体固定化技術の開発

著者	宮尾 寛樹
学位授与番号	17104甲情工第326号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10228/00006198">http://hdl.handle.net/10228/00006198</a>

氏 名	宮尾 寛樹
学位の種類	博 士 (情報工学)
学位記番号	情工博甲第326号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	高感度イムノセンシング系の構築を指向した固相基板上への抗体固定化技術の開発
論文審査委員	主 査 准教授 末田 慎二 教 授 坂本 順司 准教授 前田 衣織 " 大橋 健

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

イムノセンシングは、抗原抗体反応を利用した分析技術であり、生体成分等を対象とした分析に幅広く活用されている。このイムノセンシングでは、一般に抗体を固相基板上に固定化する必要があり、この抗体の固定化が分析性能に大きな影響を及ぼすことが知られている。そこで、本研究では、高感度なイムノセンシング系の構築を目指し、特殊な酵素反応系と抗体結合タンパク質を組み合わせた、固相基板上への抗体固定化技術の開発を行った。具体的には、古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系と、黄色ブドウ球菌由来の抗体結合タンパク質である Protein A の抗体結合ドメイン (Z-domain) を利用した。*S. tokodaii* 由来の同酵素反応系は、ビオチンリガーゼ (BPL) がビオチン化された基質タンパク質 (BCCP) と非常に安定な複合体を形成するという性質を有している。本研究では、この特性を活用して Z-domain を固相基板上へ固定化し、それを介して抗体を固定化する技術の開発を行った。

まず、高感度なイムノセンシング系を簡便に構築することを目的として、一段階のビオチン化反応に基づいた抗体固定化技術の開発を行った。具体的には、遺伝子工学的手法を利用して、Z-domain と BCCP を連結した融合タンパク質 (Z-BCCP) を作製し、その融合タンパク質を、ビオチン化反応を介して固相基板上へ固定化する技術の開発を行った。ここでは、固相基板として水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法のセンサーチップを利用し、その振動数変化から基板上へのタンパク質の結合量を評価した。ビオチン化反応に基づいて Z-BCCP を固定化した QCM センサーチップ上に、抗体を添加したところ、顕著な振動数の低下が見られ、さらに抗原の添加に伴い再び大きな振動数の低下が見られた。これより、本手法を利用してセンサーチップ上に、抗体を捕捉し、抗原抗体反応を検出できることがわかった。さらに、本手法の有用性を評価するために、

抗体を直接センサーチップ上に物理吸着させた系との比較を行った。その結果、本手法を利用した系の方が、10 倍以上大きなレスポンスの変化を示し、本手法を利用してより高感度なイムノセンシング系を構築することが可能であることを示すことができた。

次により高感度なイムノセンシング系を構築することを目的として、多段階のビオチン化反応を利用した抗体固定化技術の開発を行った。ここではまず **Z-domain** の両端に **BCCP** と **BPL** を連結した融合タンパク質 (**BCCP-Z-BPL**) を用いた技術の開発を試みた。**BCCP-Z-BPL** は、その分子内に会合ユニット 1 セット有するため、**BPL** を固定化した基板上に、この融合タンパク質を連続的に添加し、多段階的にビオチン化反応を行うことにより、基板上で **Z-domain** のポリマーを形成できるものと考えた。実際に、この融合タンパク質を作製し、基板上で同タンパク質のポリマーを固定化することには成功したが、そのポリマー化反応を制御することが困難であることがわかった。

そこで、次に別のアプローチによる **Z-domain** のポリマー化を試みた。ここでは、**BPL** 二分子を連結した **BPL** ダイマーと、**Z-domain** の両端に **BCCP** を連結した融合タンパク質 (**BCCP-Z-BCCP**) を利用した。この系では **BPL** を固定したセンサーチップ上に、**BCCP-Z-BCCP** と **BPL** ダイマーを交互に添加することにより、基板上に **Z-domain** のポリマーを、その重合度を制御して固定化できるものと考えた。実際に **BPL** を固定化した表面プラズモン共鳴 (**SPR**) 法のセンサーチップ上に両タンパク質を段階的に添加し、そのレスポンスの変化を観察したところ、両タンパク質の添加に伴い、各段階で **SPR** シグナルの増大が観察された。これより期待通り、**BCCP-Z-BCCP** と **BPL** ダイマーを利用して、**Z-domain** のポリマーを任意の重合度でセンサーチップ上に固定化できることがわかった。さらに、このセンサーチップに対して、抗体及び抗原を添加すると顕著な **SPR** シグナルの増大が観察され、イムノセンシング系として活用できることも確認できた。現段階ではまだ **Z-domain** のポリマー化に伴う検出感度の増大効果は限定的であるが、今後、実験系の最適化により、より高感度な検出系の構築も可能であると考えられる。さらに、本技術は、他のタンパク質の固定化にも適用できる新規なアプローチであるため、学術的にも価値の高い研究である。例えば本技術を利用してプロテインチップを作製し、タンパク質の網羅的な相互作用解析系も構築することも可能である。したがって、本技術は生命現象を解明し、そこから生命情報を取り出すためのツールの 1 つとして積極的に活用することが可能であり、生命情報工学分野の研究にも大きく貢献できる技術であると言える。

## 学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文に関し、調査委員から単層系と三次元系での抗体の固定化密度の違いや、**BPL** に導入するシステイン残基の数の最適値、抗体結合タンパク質として **Z-domain** を使う利点、ポリマーの溶液中での直接観察の可能性などについて質問がなされたが、いずれ

も著者から満足（明確）な回答が得られた。また、公聴会においても、多数の出席者があり、種々の質問がなされたが、いずれも著者の説明によって質問者の理解が得られた。

以上により、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（情報工学）の学位に十分値するものであると判断した。